

اثر مهارى گابا بر ترشح انسولين تحريك شده توسط گلوکز از جزاير لانگرهانس جدا شده‌ی پانكراس موش صحرایی

فرزانه فرجی^۱، دکتر اصغر قاسمی^۲، دکتر مریم خسروی^۲، دکتر فرشته معتمدی^۱، دکتر صالح زاهدی اصل^۲

(۱) بخش زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، (۲) مرکز تحقیقات غدد، پژوهشکده‌ی

علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی، نشانی مکاتبه‌ی

نویسنده‌ی مسئول: تهران، صندوق پستی ۴۷۶۳-۱۹۳۹۵، دکتر صالح زاهدی اصل

e-mail: Zahedi@endocrine.ac.ir

چکیده

مقدمه: اسید آمینه‌ی گابا در بعضی از نورون‌های مهارى سیستم عصبی مرکزی وجود دارد و در سال‌های اخیر وجود آن در پانكراس نیز ثابت شده است. در مورد اثر گابا بر ترشح انسولين از جزاير لانگرهانس گزارش‌های متناقضی وجود دارد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر گابا بر ترشح انسولين تحريك شده توسط گلوکز از جزاير جدا شده لانگرهانس بود. **مواد و روش‌ها:** جزاير لانگرهانس از پانكراس ۴۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده‌ی وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم با روش هضمی کلاژناز جدا شد و ترشح آن‌ها به صورت هشت‌تایی در کاپ‌های حاوی کربس در معرض غلظت‌های مختلف گلوکز در حضور و عدم حضور گابا (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار)، باکلوفن (۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکرومولار) (آگونیست $GABA_B$) و ساکلوفن (۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) (آنتاگونیست $GABA_B$) مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت انسولين به روش الیزا اندازه‌گیری شد. یافته‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میزان ترشح انسولين در هر جزیره در دقیقه گزارش و P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد. یافته‌ها: وجود گابا در محیط انکوباسیون در حضور گلوکز ۸/۳ و ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز ترشح انسولين را از جزاير لانگرهانس به طور معنی‌داری کاهش داد. غلظت‌های مختلف باکلوفن در حضور ۸/۳ و ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز اثری بر ترشح انسولين نداشت. حضور غلظت ۱۰۰ میکرومولار ساکلوفن همراه با ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز ($91 \pm 8/8 \mu U/islet/60min$) به طور معنی‌داری ترشح انسولين را در مقایسه با غلظت ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز به تنهایی ($67/7 \pm 2/58 \mu U/islet/60min$) افزایش داد. نتیجه‌گیری: گابا بر ترشح انسولين تحريك شده توسط گلوکز اثر مهارى دارد. نقش تنظیمی گابای موجود در سلول‌های بتا (β) در ترشح انسولين و اثر احتمالی آن در فیزیوپاتولوژی دیابت نیاز به توجه بیشتری دارد.

واژگان کلیدی: گابا، باکلوفن، ساکلوفن، انسولين، گلوکز، جزاير لانگرهانس، موش صحرایی

دریافت مقاله: ۸۶/۴/۱۱ - دریافت اصلاحیه: ۸۶/۵/۱۷ - پذیرش مقاله: ۸۶/۵/۲۲

مقدمه

تنظیم ترشح انسولين از سلول‌های بتا می‌تواند از راه‌های متفاوتی از جمله تغییر غلظت گلوکز خون، هورمون‌های مختلف و میانجی‌های عصبی انجام شود که مسیر انتقال پیام درون‌سلولی هر کدام متفاوت است.^{۱،۲} در سال‌های اخیر تنظیم پاراکرین فعالیت سلول‌های B مورد تأکید قرار گرفته است. از جمله ترکیباتی که به عنوان عامل پاراکرین و

اتوکرین در تنظیم فعالیت سلول‌های B پیشنهاد شده، گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA) است. گابا به طور عمده در نورون‌ها و سیستم عصبی مرکزی (CNS)^{۳،۴} که اثر مهارى دارند، یافت می‌شود اگرچه در برخی بافت‌ها اثر تحریکی آن نیز گزارش شده است.^۵ وجود این میانجی در بافت‌های دیگر مانند پانكراس نیز گزارش شده است.^۶ مطالعه‌های ایمونوسیتوشیمی نشان داده که گابا و آنزیم سنتزکننده‌ی آن یعنی گلوتامات دکربوکسیلاز (GAD) در سلول‌های B و

همچنین سلول‌های A وجود دارد.^{۷-۱۲} مشخص شده که گابا در CNS دارای سه نوع رسپتور می‌باشد که دو نوع رسپتور آن جزء گیرنده‌های مؤثر آیونورسپتورها ($GABA_A$) و نوع دیگر جزء متابورسپتورها ($GABA_B$) است.^{۱۳،۱۴} وجود رسپتورهای GABAB و همچنین بیان ژن آن در سلول‌های بتا نیز به اثبات رسیده است.^{۱۵} گابا و انسولین با تحریک سلول‌های بتای پانکراس توسط گلوکز از سلول‌های B به طور همزمان آزاد می‌شوند.^{۱۶} یافته‌ها در مورد اثر تنظیمی گابا بر ترشح انسولین متناقض هستند. برخی گزارش‌ها نشان داده‌اند که گابا ترشح انسولین و گلوکاگون را کاهش می‌دهد.^{۱۷} مطالعه‌ای که روی پانکراس پرفیوز شده‌ی موش صحرایی و سگ انجام شد، نشان داد که گابا موجب کاهش ترشح انسولین می‌شود،^{۱۸،۱۹} در حالی که مطالعه‌های دیگر پیشنهاد می‌کنند که گابا روی ترشح انسولین در پانکراس پرفیوز شده موش صحرایی اثری ندارد.^{۲۰،۲۱} در رابطه با مکانیسم اثر گابا روی سلول B نیز توافق کاملی وجود ندارد. برخی مطالعه‌ها گزارش کرده‌اند که گابا از طریق رسپتور $GABA_B$ اثر می‌کند.^{۲۰} در حالی که بیان ژن رسپتور $GABA_A$ نیز در سلول‌های B گزارش شده است.^{۲۱}

با توجه به این که هنوز اثر GABA در ترشح انسولین قطعی نشده است، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثر گابا روی ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس تحریک شده توسط گلوکز و اثر آگونیست (باکلوفن) و آنتاگونیست (ساکلوفن) اختصاصی رسپتور $GABA_B$ انجام شد.

مواد و روش‌ها

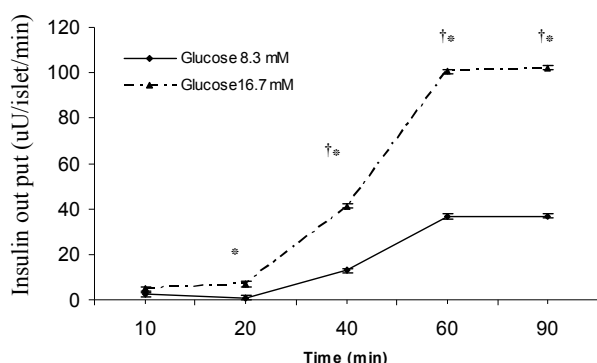
در این مطالعه از ۴۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده‌ی وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم تهیه شده از حیوانخانه‌ی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج) استفاده شد. حیوانات در شرایط دمایی 22 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد و چرخه‌ی نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در حیوانخانه‌ی پژوهشکده‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم نگهداری شدند. حیوانات به آب و غذا (خوراک موش تهیه شده از شرکت خوراک دام پارس، ایران) دسترسی آزاد داشتند.

برای جداسازی جزایر لانگرهانس از تکنیک هضمی کلاژناز استفاده شد.^{۲۲} به طور خلاصه، پس از بیهوشی با اتر، سر حیوان جدا و پس از تخلیه‌ی کامل خون از بدن

ناحیه‌ی شکم باز شد. پس از مسدود کردن محل ورود مجرای مشترک صفراوی به دوازدهه از طریق یک کاتتر باریک (شماره‌ی ۱۸) ۱۰ میلی‌لیتر محلول نمکی هنکس (HBSS)^۱ سرد [(کلرید سدیم ۱۲۶، کلرید پتاسیم ۵/۳۶، کلرید کلسیم ۱/۲۶، سولفات منیزیم ۰/۸۱، فسفات دی‌سدیم هیدروژن ۰/۲۳، فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم ۰/۴۴ و بیکربنات سدیم ۴/۱۶ (بر حسب میلی‌مول)]^{۲۳} حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در میلی لیتر کلاژناز - P (شرکت Roche، آلمان) به داخل مجرای مشترک صفراوی تزریق شد.^{۲۴} با تزریق محلول حاوی کلاژناز، پانکراس متسع شده بلافاصله از بدن حیوان خارج و پس از جدا کردن بافت‌های چربی و غدد لنفاوی، به درون لوله‌ی فالفون پلاستیکی که حاوی ۵ میلی‌لیتر هنکس و کلاژناز منتقل و به مدت ۱۷ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار داده شد.^{۲۵} در انتهای زمان انکوباسیون، محتویات لوله با استفاده از هنکس سرد به حجم نهایی ۳۵ میلی لیتر رسانده و لوله به مدت ۱ دقیقه با دست تکان داده شد. محتویات به داخل کریستالیزور (حجم ۱۵۰ میلی‌لیتر) منتقل، هنکس سرد تا لبه‌ی کریستالیزور اضافه و محتویات کریستالیزور به آرامی مخلوط شد. پس از گذشت ۹۰ ثانیه، محلول فوقانی توسط ساکشن تخلیه و عمل شستشو ۲ بار دیگر تکرار می‌شد. سوسپانسیون نهایی از صافی (با منافذ ۵۰۰ میکرومتر) عبور داده شده، دوباره با هنکس سرد شسته شد. رسوب باقی مانده که حاوی جزایر لانگرهانس جدا شده است درون سینی یخ قرار داده شد و با استفاده از استریو میکروسکوپ (Kyowa مدل SDZ-TR-PL، ژاپن) و به کمک پیت پاستور شیشه‌ای جزایر جدا و به درون پتری دیش دیگری منتقل شد.^{۲۶}

با استفاده از پیت پاستور زیر استریومیکروسکوپ هشت عدد از جزایر جدا و به هر یک از کاپ‌های واقع در سینی یخ منتقل شد. پس از خارج کردن محلول هنکس به کاپ‌های حاوی جزایر، ۱ میلی لیتر محلول کربس [حاوی کلرید سدیم (۱۱۵)، کلرید پتاسیم (۵)، کلرید منیزیم (۱)، کلرید کلسیم (۲/۵)، بیکربنات سدیم (۲۴) (شرکت Merck، آلمان) HEPES ۱۶ (شرکت Sigma، آمریکا) (بر حسب میلی‌مول) و ۰/۵ گرم در دسی‌لیتر آلبومین گاوی (شرکت Sigma، آمریکا)] اضافه شد.^{۲۷} محلول کربس در آزمایش‌های مختلف دارای غلظت‌های مختلف گلوکز و آگونیست‌ها و

۳/۷۲ ± ۴۱/۲۸، ۵/۷۷ ± ۱۰۰/۵ و ۶/۲۹ ± ۱۰۲/۲۴ میکرويونيت به ازای جزيره در دقیقه بود) اختلاف معنی داری را نشان داد (در زمان ۲۰ دقیقه $p < ۰/۰۵$ و در زمان های ۴۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه $p < ۰/۰۰۱$) (نمودار ۱). همچنین مقایسه ی میزان ترشح انسولين از جزایر لانگرهانس در زمان های انکوباسیون مختلف در حضور هر یک از غلظت های گلوکز (۸/۳ و ۱۶/۷ میلی مولار)، اختلاف معنی داری را نشان داد (برای زمان های ۴۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه در مقایسه با زمان ۱۰ دقیقه $p < ۰/۰۰۱$) (نمودار ۱).



نمودار ۱- ترشح انسولين از جزایر لانگرهانس در زمان های مختلف انکوباسیون در حضور غلظت های ۸/۳ و ۱۶/۷ میلی مولار گلوکز. (*: تفاوت معنی دار نسبت به غلظت ۸/۳ میلی مولار گلوکز ($p < ۰/۰۵$) و †: تفاوت معنی دار نسبت به زمان ۱۰ دقیقه انکوباسیون ($p < ۰/۰۰۱$)).

اثر گابا در زمان های مختلف در حضور گلوکز: مقایسه ی اثر گابا در زمان های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه به طور جداگانه بر میزان ترشح انسولين از جزایر لانگرهانس در حضور غلظت های مختلف گلوکز (۸/۳ و ۱۶/۷ میکرو مولار) نشان داد که ترشح انسولين در حضور غلظت ۸/۳ میلی مولار گلوکز و ۵۰ میکرو مولار گابا در زمان های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب $۰/۳۶ \pm ۰/۱۷$ ، $۰/۳۱ \pm ۰/۱۶$ ، $۰/۳۱ \pm ۰/۱۸$ ، $۰/۳۱ \pm ۰/۱۸$ و $۰/۳۱ \pm ۰/۱۸$ و $۳۱/۷۹ \pm ۲/۴۲$ و $۳۱/۲۷ \pm ۲/۹۸$ (نمودار ۲) و برای ۱۶/۷ میلی مولار گلوکز در حضور ۵۰ میکرو مولار گابا $۳/۲۹ \pm ۱/۳$ ، $۲/۹۹ \pm ۰/۹۶$ ، $۴۰/۸۲ \pm ۳/۳۱$ ، $۷۸/۶۷ \pm ۶/۲۴$ و $۱۰۳/۵۱ \pm ۶/۶۳$ و میکرو یونیت به ازای جزیره در ۶۰ دقیقه بود (نمودار ۳). در این آزمون ترشح انسولين در حضور گابا (۵۰ میکرومولار) در مقایسه با حضور گلوکز (۸/۳ و ۱۶/۷ میلی مولار) به

آنتاگونیست های گابا (گابا، باکلوفن و ساکلوفن) (شرکت Sigma، امریکا) بود (گلوکز، گابا، آگونیست و آنتاگونیست گابا همزمان اضافه شدند). کاپ ها به محفظه ی شیشه ای که درب آن توسط درپوش پلاستیکی بسته می شد منتقل و در حمام ۳۷ درجه ی سانتی گراد انکوبه شدند و در پنج دقیقه ی اول انکوباسیون جزایر در معرض گاز کربوژن (۹۵٪ اکسیژن و ۵٪ گاز کربنیک) قرار گرفتند. بعد از پایان مدت انکوباسیون که برای آزمایش های مختلف مدت آن متغیر بود (۱۰، ۲۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه) محلول رویی با استفاده از پیپت پاستور جدا، به میکروتیوپ منتقل و تا زمان اندازه گیری در دمای -۷۰ درجه ی سانتی گراد نگهداری شد. برای هر بار آزمایش، از هر غلظت ۵ کاپ گذاشته شد که در مجموع هر غلظت ۲۵ بار تکرار شد.

انسولين با روش الایزا توسط کیت اختصاصی انسولين موش صحرایی موش صحرایی (شرکت Mercodia، سوئد) اندازه گیری شد. ضریب تغییرات درون سنجی و برون سنجی روش به ترتیب ۶/۰ و ۹/۷ درصد بود.

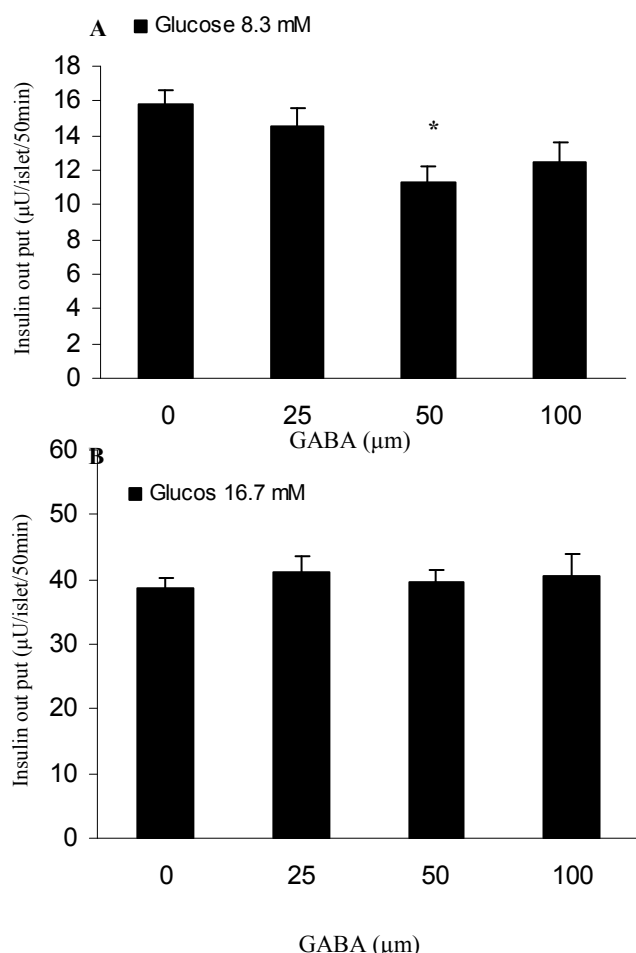
یافته ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میزان انسولين ترشح شده از جزایر (میکرويونيت از هر جزیره لانگرهانس در واحد زمان) بیان شده است. با استفاده از نرم افزار SPSS برای بررسی وجود اختلاف معنی دار بین زمان های مختلف انکوباسیون از آنالیز واریانس دو طرفه و به منظور بررسی اختلاف بین نمونه های واجد یا فاقد آگونیست یا آنتاگونیست گابا از آنالیز واریانس یک طرفه به همراه آزمون توکی استفاده شد. مقدار p کمتر از ۰/۰۵ معیار معنی دار بودن تفاوت ها در نظر گرفته شد.

یافته ها

ترشح انسولين در زمان های متفاوت انکوباسیون:

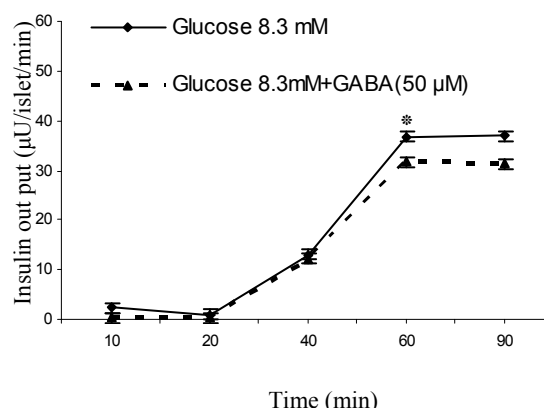
میزان ترشح انسولين در زمان های مختلف انکوباسیون در دو غلظت گلوکز (۸/۳ و ۱۶/۷ میلی مولار) نشان می دهد که ترشح انسولين هم وابسته به دوز و هم وابسته به زمان است به طوری که میزان ترشح انسولين در حضور غلظت ۸/۳ میلی مولار گلوکز در زمان های انکوباسیون ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه (که به ترتیب $۰/۳۵ \pm ۰/۰۸$ ، $۰/۳۱ \pm ۰/۰۸$ ، $۰/۳۱ \pm ۰/۰۸$ ، $۰/۳۱ \pm ۰/۰۸$ و $۰/۳۱ \pm ۰/۰۸$ و $۳۶/۶۷ \pm ۲/۹۶$ و $۳۶/۹۸ \pm ۳/۴$ میکرو یونیت به ازای جزیره در دقیقه بود) در مقایسه با حضور غلظت ۱۶/۷ میلی مولار گلوکز (که به ترتیب $۴/۷۷ \pm ۱/۵۹$ ، $۶/۸۳ \pm ۱/۹۷$ ،

در ۵۰ دقیقه بود. میزان ترشح انسولین برای غلظت ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز در حضور غلظت‌های مختلف گابا به ترتیب $41/21 \pm 2/47$ ، $39/6 \pm 1/94$ و $40/56 \pm 3/2$ و در غلظت ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز به تنهایی $38/68 \pm 1/63$ میکرویونیت به ازای جزیره در ۵۰ دقیقه بود. مدت ۵۰ دقیقه برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف گابا پیشنهاد شده است زیرا در ۶۰ دقیقه انکوباسیون نمودار به کفه می‌رسد و مشخص نمی‌شود که غلظت‌های بالا یا پایین گابا روی ترشح انسولین چه اثری می‌گذارد. در این آزمون فقط غلظت ۵۰ میکرومولار گابا در حضور غلظت ۸/۳ میلی‌مولار گلوکز اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/05$) (نمودارهای ۴ A, B).

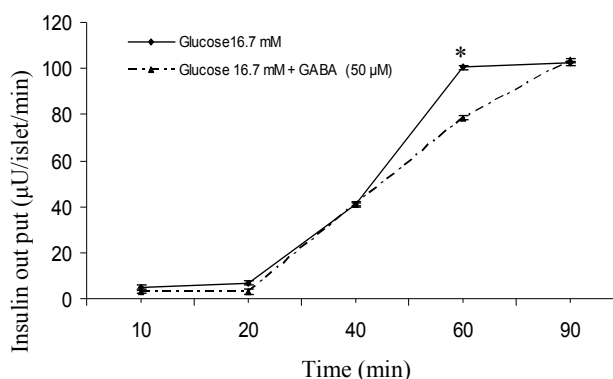


نمودار ۴- A: ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس در حضور غلظت‌های مختلف گابا (۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) همراه با غلظت ۸/۳ میلی‌مولار گلوکز. *: تفاوت معنی‌دار نسبت به غلظت ۸/۳ میلی‌مولار گلوکز به تنهایی ($p < 0/05$). B: ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس در حضور غلظت‌های مختلف گابا (۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) همراه با غلظت ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز در مدت ۵۰ دقیقه انکوباسیون.

تنهایی در زمان ۶۰ دقیقه کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/05$) (نمودارهای ۲ و ۳).



نمودار ۲- ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس در زمان‌های مختلف انکوباسیون در حضور غلظت ۸/۳ میلی‌مولار گلوکز با حضور و بدون حضور غلظت ۵۰ میکرومولار گابا. *: تفاوت معنی‌دار نسبت به غلظت ۸/۳ میلی‌مولار گلوکز ($p < 0/05$).

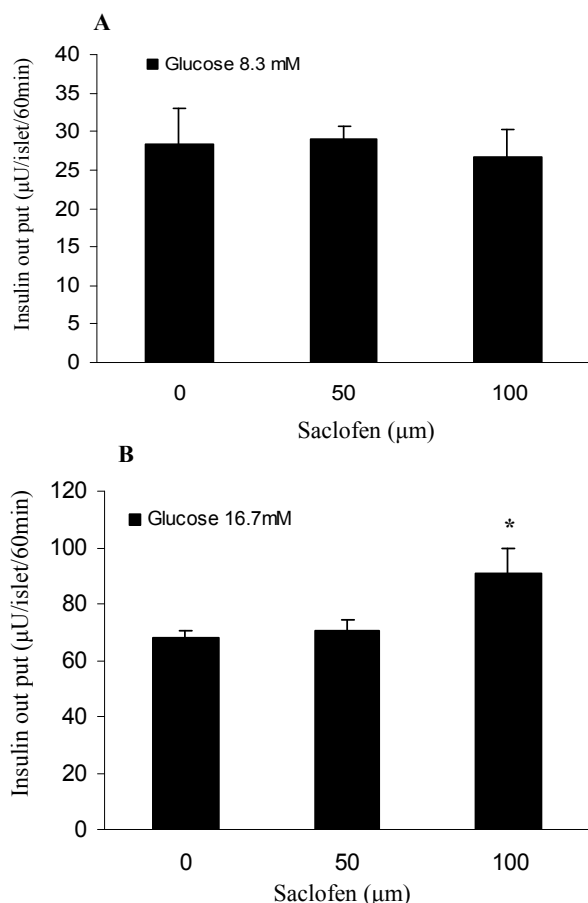


نمودار ۳- ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس در زمان‌های مختلف انکوباسیون در حضور غلظت ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز با حضور و بدون حضور غلظت ۵۰ میکرومولار گابا. *: تفاوت معنی‌دار نسبت به غلظت ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز ($p < 0/05$).

اثر غلظت‌های مختلف گابا در حضور گلوکز بر ترشح

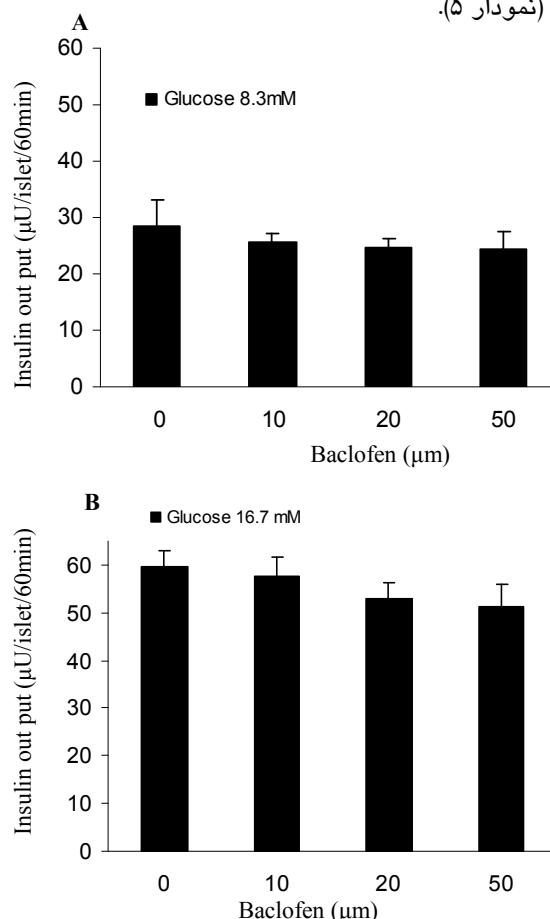
انسولین: مقایسه‌ی اثر غلظت‌های مختلف گابا (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) در حضور غلظت‌های مختلف گلوکز (۸/۳ و ۱۶/۷ میلی‌مولار) بر ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس نشان داد که میزان ترشح انسولین در حضور غلظت‌های مختلف گابا همراه با غلظت ۸/۳ میلی‌مولار گلوکز به ترتیب $12/5 \pm 1/11$ و $11/36 \pm 0/89$ ، $14/59 \pm 1/03$ ازای جزیره در ۵۰ دقیقه بود که این میزان در غلظت ۸/۳ میلی‌مولار گلوکز، $15/82 \pm 0/8$ میکرویونیت به ازای جزیره

اثر آنتاگونیست اختصاصی GABAB (ساکلوفن) بر ترشح انسولين: مقایسه‌ی اثر غلظت‌های مختلف ساکلوفن (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) در حضور غلظت‌های ۸/۳ و ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز بر ترشح انسولين از جزایر لانگرهانس نشان داد که ترشح انسولين در حضور غلظت ۸/۳ میلی‌مولار گلوکز و غلظت‌های مختلف ساکلوفن به ترتیب $28/98 \pm 1/72$ و $26/75 \pm 3/59$ در مقایسه با غلظت گلوکز به تنهایی $28/44 \pm 4/65$ میکرویونیت به ازای جزیره در ۶۰ دقیقه بود (نمودار A ۶). و برای غلظت ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز ترشح انسولين در حضور غلظت‌های مختلف ساکلوفن به ترتیب $70/2 \pm 4/1$ و $91 \pm 8/8$ در مقایسه با غلظت ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز به تنهایی $67/7 \pm 2/53$ میکرو یونیت به ازای جزیره در ۶۰ دقیقه بود (نمودار B ۶). در این آزمون اثر ساکلوفن بر ترشح انسولين فقط در غلظت ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز به طور معنی‌داری افزایش نشان داد ($p < 0/05$) (نمودار B ۶).



نمودار ۶- A: ترشح انسولين از جزایر لانگرهانس در حضور غلظت‌های مختلف ساکلوفن (۵۰ و ۱۰۰ میکرو مولار) و غلظت ۸/۳ میلی‌مولار گلوکز. **B:** ترشح انسولين از جزایر لانگرهانس در حضور غلظت‌های مختلف ساکلوفن (۵۰ و ۱۰۰ میکرو مولار) و غلظت ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز در مدت ۶۰ دقیقه انکوباسیون. *: تفاوت معنی‌دار نسبت به غلظت ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز به تنهایی ($p < 0/05$).

اثر آکونیست اختصاصی GABAB (باکلوفن) بر ترشح انسولين: میزان ترشح انسولين از جزایر لانگرهانس در حضور غلظت‌های مختلف باکلوفن (۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکرومولار) همراه با غلظت‌های گلوکز (۸/۳ و ۱۶/۷ میلی‌مولار) نشان داد که میزان ترشح انسولين در حضور غلظت ۸/۳ میلی‌مولار گلوکز به ترتیب $24/7 \pm 1/42$ و $24/3 \pm 3/14$ میکرو یونیت به ازای جزیره در ۶۰ دقیقه و با گلوکز ۸/۳ میلی‌مولار، $28/4 \pm 4/6$ میکرویونیت به ازای جزیره در ۶۰ دقیقه به تنهایی بود (نمودار ۵A). این میزان در حضور غلظت ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز به ترتیب $57/6 \pm 4/2$ و $49/9 \pm 3/37$ میکرویونیت به ازای جزیره در ۶۰ دقیقه و با غلظت ۱۶/۷ گلوکز $60 \pm 2/96$ میکرو یونیت به ازای جزیره در ۶۰ دقیقه به تنهایی بود (نمودار ۵B). این آزمون نشان داد که با افزایش غلظت باکلوفن میزان ترشح انسولين کاهش نشان داده ولی این کاهش معنی‌دار نبود. (نمودار ۵).



نمودار ۵- A: ترشح انسولين از جزایر لانگرهانس در حضور غلظت‌های مختلف باکلوفن (۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکرو مولار) در حضور غلظت ۸/۳ میلی‌مولار گلوکز. **B:** ترشح انسولين از جزایر لانگرهانس در حضور غلظت‌های مختلف باکلوفن (۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکرو مولار) در حضور غلظت ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز در مدت ۶۰ دقیقه انکوباسیون.

بحث

ترشح انسولین القا شده توسط غلظت‌های $۸/۳$ و $۱۶/۷$ میلی‌مولار در زمان‌های مختلف انکوباسیون نشان داد که گابا با غلظت ۵۰ میکرومولار میزان ترشح انسولین را از جزایر لانگرهانس در زمان ۶۰ دقیقه انکوباسیون به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (نمودار ۲ و ۳). مطالعه‌هایی که روی سلول‌های INS-1 انجام شده است بیان می‌دارد که گابا در غلظت‌های ۱ تا ۱۰۰۰ میکرومولار در حضور غلظت‌های پایین گلوکز به صورت وابسته به دوز موجب افزایش ترشح انسولین ولی همراه با گلوکز ۲۸ میلی‌مولار موجب کاهش ترشح انسولین می‌شود. همچنین بیان شده است که گابا با غلظت‌های ۱ تا ۱۰۰ میکرومولار به تنهایی غلظت درون سلولی کلسیم را افزایش می‌دهد ولی در حضور گلوکز ۲۸ میلی‌مولار، کلسیم داخل سلولی کاهش می‌یابد.^{۲۷،۲۸} تحریک ترشح انسولین توسط گلوکز از طریق افزایش نسبت ADP به ATP درون سلولی است که به نوبه‌ی خود سبب بسته شدن کانال‌های پتاسیمی وابسته به ATP می‌شود. در نتیجه موجب دپلاریزاسیون غشای سلول B شده و به دنبال آن کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ باز شده و کلسیم داخل سلولی افزایش می‌یابد که در نهایت ترشح انسولین و گابا که هر کدام در وزیکول‌های جداگانه ذخیره شده‌اند، را تحریک می‌کند.^{۲۹،۳۰}

وجود رسپتورهای $GABA_B$ و بیان ژن آن در سلول‌های B به اثبات رسیده است.^{۲۰،۲۱} برخی مطالعه‌ها نشان داده‌اند که گابا از طریق رسپتور $GABA_B$ موجب مهار ترشح انسولین می‌شود.^{۲۰،۲۱} رسپتور $GABA_B$ یک متابورسپتور است که از طریق مهار آدنیلات سیکلاز عمل می‌کند در نتیجه باعث کاهش cAMP می‌شود.^{۳۱} و کلسیم داخل سلولی را کاهش و از ترشح انسولین جلوگیری می‌کند.

با توجه به این که گابا به طور همزمان با انسولین ترشح می‌شود، می‌توان بیان کرد که گابا با عمل اتوکراین موجب مهار ترشح انسولین می‌شود اما این نکته که نقش فیزیولوژیک آن چه می‌تواند باشد نیاز به مطالعه‌ی بیشتر دارد.

اثر غلظت‌های مختلف گابا (۲۵ ، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) روی ترشح انسولین القا شده توسط غلظت‌های $۸/۳$ و $۱۶/۷$ میلی‌مولار گلوکز نشان داد که گابا با غلظت ۵۰ میکرومولار در حضور غلظت $۸/۳$ میلی‌مولار گلوکز در مدت ۵۰ دقیقه

انکوباسیون به طور معنی‌داری موجب کاهش ترشح انسولین می‌شود (نمودار ۴). این در حالی است که در همین زمان گابا در حضور غلظت $۱۶/۷$ میلی‌مولار گلوکز نتوانست اثر مهاری نشان دهد بنابراین شاید بتوان پیشنهاد کرد که به دلیل اثر تحریکی غلظت بالای گلوکز ($۱۶/۷$ mM)، این طول زمان انکوباسیون برای نشان دادن اثر مهاری گابا کافی نیست و به زمان طولانی‌تری برای اعمال اثر نیاز است. شاید هم به دلیل اثر تحریکی قوی‌تری گلوکز $۱۶/۷$ میلی‌مولار نیاز به حضور غلظت بیشتری از گابا در محیط وجود داشته است. برخی مطالعه‌ها نشان داده‌اند که گابا نقش تحریکی بر ترشح انسولین القا شده توسط گلوکز از جزایر لانگرهانس دارد^۳ که البته آن مطالعه بر روی یک قطعه ($۲-۱$ میلی‌متر مکعب) از بافت پانکراس انجام شده است. این قطعه در بافر کربس در حمام ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه پیش انکوبه و سپس گابا به محیط افزوده شد.^۳ این مطالعه با گزارش‌های کاواکینی که بیان می‌دارد گابا به طور معنی‌داری سطح انسولین سرم مردان را افزایش می‌دهد مطابقت دارد.^{۳۲} اختلاف یافته‌های مطالعه‌ی حاضر با مطالعه‌های دیگر که نتوانسته‌اند اثر مهاری گابا را در ترشح انسولین نشان دهند^{۱۱،۱۷} می‌تواند به دلیل اختلاف در نوع مطالعه باشد.

از آن جا که این مطالعه روی جزایر لانگرهانس انجام شد و این جزایر شامل سلول‌های A و B و D و F است که هر کدام عمل پاراکرینی روی همدیگر دارند احتمال می‌رود گابا اثر خود را در ترشح انسولین از طریق اثر روی ترشح این سلول‌ها اعمال کند. یافته‌های برخی مطالعه‌ها وجود رسپتور $GABA_A$ و بیان ژن آن را در سلول‌های A جزایر گزارش کرده‌اند و بیان داشتند که گابا از طریق این رسپتور موجب مهار ترشح گلوکاگون می‌شود.^{۳۳} همچنین بنا به یک گزارش فعالیت رسپتور $GABA_B$ اثری اختصاصی روی ترشح گلوکاگون از سلول‌های A و سوماتوستاتین از سلول‌های D ندارد، به طوری که در آن گزارش باکوفن (۱۰ میکرومولار) نتوانست اثری روی ترشح گلوکاگون و سوماتوستاتین بگذارد.^{۲۰} بنابراین اثر مهاری مشاهده شده بر ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس از طریق اثر بر ترشح گلوکاگون و سوماتوستاتین نیست. همچنین، در حضور گلوکز ترشح گلوکاگون به طور فیزیولوژیک مهار می‌شود و گلوکاگون وجود نخواهد داشت تا کاهش ترشح آن موجب مهار ترشح انسولین شود. در عین حال به نظر می‌رسد که اثر گابا بر

غلظت‌های مختلف آنتاگونیست اختصاصی رسپتور $GABA_B$ (ساکلوفن) در حضور غلظت ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز نشان داد ساکلوفن موجب افزایش ترشح انسولين از جزایر لانگرهانس می‌شود (نمودار ۶). یافته‌های حاصل از مطالعه‌های که روی سلول‌های A، B و D جزایر لانگرهانس کشت داده شده موش صحرایی انجام شده، نشان داده است که در حضور آنتاگونیست اختصاصی رسپتور گابا B (CGP55845) ترشح انسولين القا شده توسط گلوکز از سلول‌های B افزایش می‌یابد ولی روی ترشح گلوکاگون و سوماتوستاتین که به ترتیب از سلول‌های A و D ترشح می‌شوند، اثری ندارد.^{۲۰} مطالعه‌ی حاضر گزارش‌های قبلی را مبنی بر اثر افزایشی آنتاگونیست اختصاصی رسپتور گابا B (ساکلوفن) در حضور غلظت بالای گلوکز تأیید می‌کند. با توجه به این یافته می‌توان پیشنهاد کرد که $GABA$ آزاد شده به همراه انسولين به دنبال تحریک با گلوکز به صورت اتوکرین روی سلول‌های B اثر کرده، ترشح انسولين را از سلول‌های B مهار می‌کند. اگر این اثر به همین ترتیب روی سلول‌های B اعمال شود می‌توان گفت $GABA$ به عنوان عامل جلوگیری کننده از overshoot ترشح انسولين عمل می‌کند.

داده‌های مطالعه‌ی حاضر مؤید یافته‌های بعضی از مطالعه‌های دیگر است که در آنها اثر مهارى گابا در ترشح انسولين گزارش شده است. بنابراین نقش تنظیمی گابا موجود در سلول‌های بتا در ترشح انسولين و اثر احتمالی آن در فیزیوپاتولوژی دیابت باید مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری: در انجام این طرح از حمایت‌های مالی مرکز تحقیقات علوم اعصاب و نیز پشتیبانی مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز پژوهشکده‌ی علوم غدد درون ریز استفاده شد. از راهنمایی‌های علمی آقای دکتر مهدی هدایتی و خانم مژگان پادیاب برای انجام آنالیزهای آماری و همکاری خانم هدی قدکساز برای انجام آزمایش‌ها سپاسگزاری می‌شود.

ترشح گلوکاگون و سوماتوستاتین نیز نیاز به مطالعه‌های بیشتری دارد.

در این مطالعه آگونیست اختصاصی رسپتور $GABA_B$ (باکلوفن) با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکرومولار در حضور غلظت‌های ۸/۳ و ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز بر ترشح انسولين اثر معنی‌داری نداشت (نمودار ۵). مطالعه‌هایی که روی سلول‌های INS-1 پرفیوز شده در حضور غلظت‌های کم و زیاد گلوکز انجام شد، نشان داد که باکلوفن بر ترشح انسولين القا شده توسط گلوکز ۳ و ۱۰ میلی‌مولار اثری ندارد ولی ترشح انسولين القا شده توسط گلوکز ۲۵ میلی‌مولار را مهار می‌کند.^{۲۷} مطالعه‌ی دیگری نیز که گزارش قبلی را تأیید می‌کند روی سلول‌های MIN_6 انجام شده و نشان داده که باکلوفن (۰/۳ تا ۱۰ میکرومولار) در حضور غلظت‌های کم گلوکز (۱ میلی‌مولار) روی ترشح انسولين اثری ندارد ولی در غلظت‌های ۲۰ و ۲۵ میلی‌مولار گلوکز به صورت وابسته به دوز موجب کاهش ترشح انسولين می‌شود.^{۱۵،۲۰} با توجه به اثبات وجود رسپتورهای $GABA_B$ در سلول‌های B، انتظار می‌رفت که آگونیست اختصاصی این رسپتور بتواند ترشح انسولين را مهار کند. دلیل اینکه آگونیست باکلوفن علی‌رغم غلظت‌های بسیار بیشتر استفاده شده در این مطالعه نتوانست ترشح انسولين را مهار کند نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. اما شاید بتوان عدم تأثیر باکلوفن را در مهار ترشح انسولين در مطالعه‌ی حاضر به صورت‌های زیر توجیه نمود. اول، مطالعه‌های قبلی اثر مهارى باکلوفن را در غلظت بالاتری از گلوکز نشان داده‌اند و هر دو غلظت گلوکز استفاده شده در این مطالعه کمتر از غلظت گلوکز مطالعه‌ها قبلی بود. بنابراین ممکن است که برای بروز اثر مهارى باکلوفن، یک آستانه‌ی غلظتی از گلوکز لازم باشد. یک مطالعه در غلظت‌های ۱۰ تا ۲۰ میلی‌مولار گلوکز و دوزهای مختلف از باکلوفن شاید بتواند جواب این سوال را مشخص کند. دوم، بر خلاف مطالعه‌ها دیگر^{۱۵،۲۰،۲۷} که اثر مهارى باکلوفن را در سلول‌های جدا شده نشان داده‌اند، مطالعه‌ی حاضر در جزایر لانگرهانس انجام شده است.

References

1. Sjöholm A. Intracellular signal transduction pathways that control pancreatic beta-cell proliferation. *FEBS Lett* 1992; 311: 85-90.
2. Rutter GA. Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: recent advances. *Mol Aspects Med* 2001; 22: 247-84.
3. Adeghate E, Ponery AS. GABA in the endocrine pancreas: cellular localization and function in normal and diabetic rats. *Tissue Cell* 2002; 34: 1-6.

4. Storm-Mathisen J, Leknes AK, Bore AT, Vaaland JL, Edminson P, Haug FM, et al. First visualization of glutamate and GABA in neurones by immunocytochemistry. *Nature* 1983; 301: 517-20.
5. Franklin IK, Wollheim CB. GABA in the endocrine pancreas: its putative role as an islet cell paracrine-signalling molecule. *J Gen Physiol* 2004; 123: 185-90.
6. Gerber JC 3rd, Hare TA. Gamma-aminobutyric acid in peripheral tissue, with emphasis on the endocrine pancreas: presence in two species and reduction by streptozotocin. *Diabetes* 1979; 28: 1073-6.
7. Okada Y, Taniguchi H, Shimada C. High concentration of GABA and high glutamate decarboxylase activity in rat pancreatic islets and human insulinoma. *Science* 1976; 194: 620-2.
8. Vincent SR, Hökfelt T, Wu JY, Elde RP, Morgan LM, Kimmel JR. Immunohistochemical studies of the GABA system in the pancreas. *Neuroendocrinology* 1983; 36: 197-204.
9. Gomez R, Asnis N, Tannhauser SL, Barros HM. GABA agonists differentially modify blood glucose levels of diabetic rats. *Jpn J Pharmacol* 1999; 80: 327-31.
10. Garry DJ, Sorenson RL, Elde RP, Maley BE, Madsen A. Immunohistochemical colocalization of GABA and insulin in beta-cells of rat islet. *Diabetes* 1986; 35: 1090-5.
11. Gilon P, Bertrand G, Loubatières-Mariani MM, Remacle C, Henquin JC. The influence of gamma-aminobutyric acid on hormone release by the mouse and rat endocrine pancreas. *Endocrinology*. 1991; 129: 2521-9.
12. Martignat L, Elmansour A, Audrain M, Julien JF, Charbonnel B, Sai P. Pancreatic expression of antigens for islet cell antibodies in non-obese diabetic mice. *J Autoimmun* 1995; 8: 465-82.
13. Vicini S. New perspectives in the functional role of GABA(A) channel heterogeneity. *Mol Neurobiol* 1999; 19: 97-110.
14. Marshall FH, Jones KA, Kaupmann K, Bettler B. GABAB receptors-the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 396-9.
15. Brice NL, Varadi A, Ashcroft SJ, Molnar E. Metabotropic glutamate and GABA(B) receptors contribute to the modulation of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2002; 45: 242-52.
16. Anher-Hilger G, Stadtbäumer A, Strübing C, Scherübl H, Schultz G, Riecken EO, et al. gamma-Aminobutyric acid secretion from pancreatic neuroendocrine cells. *Gastroenterology* 1996; 110: 1595-604.
17. Gu XH, Kurose T, Kato S, Masuda K, Tsuda K, Ishida H, et al. Suppressive effect of GABA on insulin secretion from the pancreatic beta-cells in the rat. *Life Sci* 1993; 52: 687-94.
18. Kawai, Unger RH. Effects of gamma-aminobutyric acid on insulin, glucagon, and somatostatin release from isolated perfused dog pancreas. *Endocrinology* 1983; 113: 111-3.
19. Koeslag JH, Saunders PT, Terblanche E. A reappraisal of the blood glucose homeostat which comprehensively explains the type 2 diabetes mellitus-syndrome X complex. *J Physiol* 2003; 549: 333-46.
20. Braun M, Wendt A, Buschard K, Salehi A, Sewing S, Gromada J, et al. GABAB receptor activation inhibits exocytosis in rat pancreatic beta-cells by G-protein-dependent activation of calcineurin. *J Physiol* 2004; 559: 397-409.
21. Borboni P, Porzio O, Fusco A, Sesti G, Lauro R, Marlier LN. Molecular and cellular characterization of the GABAA receptor in the rat pancreas. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 103: 157-63.
22. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16: 35-9.
23. Shibata A, Ludvigsen CW Jr, Naber SP, McDaniel ML, Lacy PE. Standardization fo a digestion-filtration method for isolation of pancreatic islets. *Diabetes*. 1976; 25: 667-72.
24. Roche manual, Collagenase P, version 4, 2003; 1-2.
25. Fujioka T, Terasaki PI, Heintz R, Merideth N, Lanza RP, Zheng TL, et al. Rapid purification of islets using magnetic microspheres coated with anti-acinar cell monoclonal antibodies. *Transplantation* 1990; 49: 404-7.
26. Zardooz H, Zahedi Asl S, Naseri MG. Effect of chronic psychological stress on insulin release from rat isolated pancreatic islets. *Life Sci* 2006; 79: 57-62.
27. Braun M, Wendt A, Birnir B, Broman J, Eliasson L, Galvanovskis J, et al. Regulated exocytosis of GABA-containing synaptic-like microvesicles in pancreatic beta-cells. *J Gen Physiol* 2004; 123: 191-204.
28. Dong H, Kumar M, Zhang Y, Gyulkhandanyan A, Xiang YY, Ye B, et al. Gamma-aminobutyric acid up- and downregulates insulin secretion from beta cells in concert with changes in glucose concentration. *Diabetologia* 2006; 49: 697-705.
29. Satin LS, Kinard TA. Neurotransmitters and their receptors in the islets of Langerhans of the pancreas: what messages do acetylcholine, glutamate, and GABA transmit? *Endocrine* 1998; 8: 213-23.
30. Rorsman P, Berggren PO, Bokvist K, Ericson H, Möhler H, Ostenson CG, et al. Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABAA-receptor chloride channels. *Nature* 1989; 341: 233-6.
31. Than M, Szabo B. Analysis of the function of GABA(B) receptors on inhibitory afferent neurons of Purkinje cells in the cerebellar cortex of the rat. *Eur J Neurosci* 2002; 15: 1575-84.
32. Cavagnini F, Pinto M, Dubini A, Invitti C, Cappelletti G, Polli EE. Effects of gamma aminobutyric acid (GABA) and muscimol on endocrine pancreatic function in man. *Metabolism* 1982; 31: 73-7.
33. Bailey SJ, Ravier MA, Rutter GA. Glucose-dependent regulation of gamma-aminobutyric acid (GABA A) receptor expression in mouse pancreatic islet alpha-cells. *Diabetes* 2007; 56: 320-7.

Original Article

Inhibitory Effect of GABA on Glucose- Stimulated Insulin Secretion from Isolated Islets of Langerhans in Rat

Faraji F², Ghasemi A², Khosravi M¹, Motamedi F³, Zahedi Asl S²

- 1) Department of Biology, School of Science, North Tehran branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2) Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shaheed Beheshti (MC). Tehran, Iran.
3) NeuroSciences Research Center, Shaheed Beheshti University (MC), Tehran, Iran.
e-mail:zahedi@endocrine.ac.ir

Abstract

Introduction: Gamma-amino butyric acid (GABA), an amino acid, present in some inhibitory neurons of the central nervous system, is also found in relatively high levels in the islets of Langerhans. Results of different studies concerning the effect of GABA on insulin secretion are controversial. The aim of this study was to determine the role of GABA and GABAB receptors on glucose-stimulated insulin secretion in isolated islets of rats. **Materials and Methods:** The collagenase digestion technique was used to isolate the islets from pancreata of 45 male Wistar rats (200-250g). Insulin secretion was assessed in eight islets in each cup exposed to different concentrations of glucose (8.3 and 16.7 mM) in the presence or absence of GABA(25, 50, 100 μ M), baclofen (10, 20, 50 μ M) (GABAB agonist) and saclofen (50,100 μ M) (GABAB antagonist). Insulin concentration was measured by the ELISA method. Insulin release was reported as mean $\pm$ SEM μ U/islet/50min and p values of <0.05 were considered significant. **Results:** GABA inhibited glucose (8.3 and 16.7 mM)-induced insulin secretion in isolated islets ($P<0.05$). Different concentrations of baclofen had no significant effect on glucose-induced insulin secretion; however glucose (16.7mM) stimulated insulin secretion in the presence of 100 μ M saclofen (91 ± 8.8 μ U/islet/60min) was significantly ($p<0.05$) higher compared to insulin secretion stimulated by 16.7mM glucose alone (67.7 ± 2.58 μ U/islet/60min). **Conclusion:** These findings indicate that GABA has an inhibitory effect on glucose-induced insulin secretion; and therefore it may play a regulatory role in insulin secretion. This effect needs to be taken in to account in the pathophysiology of diabetes.

Key word: GABA, Baclofen, Saclofen, Insulin, Glucose, Langerhans islets, Rats